

(C) WPI / Thomson

AN - 1989-389392 [33]

AP - JP19970336516 19971119

CBY - SAKA

DC - B02

DW - 199933

IC - A61K31/495; C07D215/22

LNKA- 1999-114894

M2 - [01] D012 D013 D021 D022 D023 F011 F014 F553 G001 G011 G012 G013 G014
G015 G016 G100 H1 H121 H141 H3 H201 H211 H5 H541 H542 H8 J0 J011 J3
J331 J5 J521 L9 L941 M210 M211 M212 M213 M214 M215 M216 M220 M221 M222
M223 M224 M225 M226 M231 M232 M233 M272 M281 M282 M320 M412 M511 M521
M531 M540 M710 M903 M904 P522 P631 P714 P721 P723; 9933-ACT01-H
9933-ACT01-T

MC - B06-B02 B07-B11 B14-D01 B14-F01 B14-N01 B14-N10

PA - (SAKA) OTSUKA PHARM CO LTD

PN - JP11152228 A 19990508 DW199933

PR - JP19970336516 19971119

XIC - A61K-031/495; C07D-215/22

AB - TSC-22 inducers contain piperazinyl carbostyryl compounds of formula
(I). R = benzoyl having lower alkoxy on the phenyl ring. (I) is
particularly vesnarinone (i.e. (I; R = 3,4-dimethoxybenzoyl at C6
position, and optional bond is absent)).

- USE :

For prevention and treatment of osteoporosis, endocrine diseases,
cardiac and renal diseases caused by water retention, including
cardiac failure at doses of 0.5-30 mg/kg/day up to 4 divided doses.
For predicting and prevention of blood, liver or spleen toxicity.

IW - INDUCE TREAT OSTEOPOROSIS ENDOCRINE DISEASE CARDIAC RENAL CAUSE WATER
RETAIN

IWW - INDUCE TREAT OSTEOPOROSIS ENDOCRINE DISEASE CARDIAC RENAL CAUSE WATER
RETAIN

NC - 1

NPW - 1

OPD - 1997-11-19

PAW - (SAKA) OTSUKA PHARM CO LTD

PD - 1999-06-08

TI - TSC-22 inducers - for treating e.g. osteoporosis, endocrine diseases,
cardiac and renal diseases caused by water retention

(10) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-152228

(13) 公開日 平成11年(1999)6月8日

| | | | |
|-------------------------------------|------|---------------|-----|
| (50) Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | FI | |
| A 61 K 31/495 | AED | A 61 K 31/495 | AED |
| | ABJ | | ABJ |
| | ABN | | ABN |
| | ACV | | ACV |
| | ADT | | ADT |
| 審査請求 未請求 請求項の数 3 FI (全 17 頁) 最終頁に続く | | | |

(21) 出願番号 特願平9-336518

(22) 出願日 平成9年(1997)11月19日

(71) 出願人 000206956

大塚製薬株式会社

東京都千代田区神田町2丁目9番地

(72) 発明者 川又 均

徳島県徳島市南佐古六番町6-12 ライオンズマンション徳島南佐古703

(73) 発明者 佐藤 光信

徳島県徳島市八万町下福万187-10

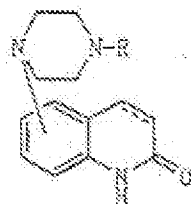
(74) 代理人 弁理士 三枝 美二 (外10名)

(54) 【発明の名称】 TSC-22誘導剤

(57) 【要約】

【構成】 本発明は、一般式

【化1】



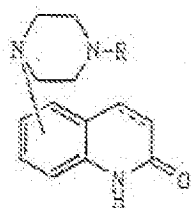
【式中、Rは、フェニル環上に低級アルキル基を有することのあるベンゾイル基を示す。カルボステリル骨格の3位と4位との炭素間結合は、一重結合又は二重結合を示す。】で表わされるカルボステリル誘導体又はその塩を有効成分とするTSC-22誘導剤を提供する。

【効果】 本発明TSC-22誘導剤は、【効果】作用に基づき骨粗鬆症を始めとする骨形成不全症の治療、心疾患、腎疾患の治療に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】一般式

【化1】



〔式中、Rは、フェニル環上に置換基として低級アルコキシ基を有することのあるベンジル基を示す。カルボステリル骨格の3位と4位との炭素間結合は、一重結合又は二重結合を示す。〕で表されるカルボステリル誘導体及びその塩から選ばれる少なくとも1種の化合物を有効成分として含有することを特徴とするTSC-22誘導剤。

【請求項2】カルボステリル誘導体が6-(4-(3,4-ジメトキシベンゾイル)-1-ピペラジニル)-3,4-ジヒドロカルボステリルである請求項1に記載のTSC-22誘導剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、特定のカルボステリル誘導体を有効成分とするTSC-22誘導剤に関する。本発明のTSC-22誘導剤は、TSC-22遺伝子の発現誘導作用を有することに基づいて、骨粗鬆症を始めとする骨形成不全症、内分泌疾患あるいはそれに続発して起こる水分貯留による心疾患、腎疾患の治療に有用である。また、上記作用は、当該誘導剤の副作用としての無顆粒球症の発症機構を解明するのに有用であり、その発症の予備あるいは予防法の開発においても有用である。

【0002】

【従来の技術】6-(4-(3,4-ジメトキシベンゾイル)-1-ピペラジニル)-3,4-ジヒドロカルボステリル（以下、ベスナリノンともいう。）を始めとするカルボステリル誘導体は、慢性心疾患の治療に用いられる経口収力剤（oral inotropic agent）として開発され（J. Am. Coll. Cardio. 9: 865-871 (1987)）、近年、ヒト唾液腺癌細胞株（human salivary gland cancer cell line; 以下、TYS細胞ともいう。; Am. J. Pathol. 124: 496-509 (1986)）を含む様々な腫瘍細胞に対して、インビボ及びインビトロで、抗増殖活性並びに分化及びアポトーシス誘導活性を有することが報告されている（Acta Histochem. Cytochem. 27: 591-599 (1994); Cancer Lett. 91: 1-9 (1995)）。このため、日本では、該化合物を有効成分とする薬物が顎頭部の固形腫瘍に対する抗癌剤として臨床試験に供されている。

【0003】我々は、最近、TYS細胞をベスナリノンで処理することにより、TGF- β 1 mRNA及びp2

1^{ras} mRNA、並びにそれらの蛋白質が誘導されることを報告している（Cancer Lett. 112: 181-189 (1997)）。

【0004】

【課題が解決しようとする課題】本発明は、ベスナリノン等のカルボステリル誘導体の新たな作用、並びにその作用に基づく新規用途を提供することを目的とする。より具体的には、本発明はベスナリノン等のカルボステリル誘導体又はそれらの塩のTSC-22誘導剤としての新規用途を提供することを目的とする。

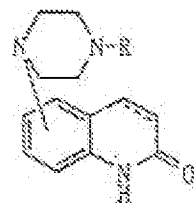
【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、ベスナリノンを始めとする特定のカルボステリル誘導体の新規用途を開発すべく、鋭意研究を重ねていたところ、TYS細胞をベスナリノンで処理することによりTSC-22 mRNAの発現が増強されることを見出し、また誘導されたTSC-22が細胞の成長・増殖並びにCNP（C-type natriuretic peptide）を介したTGF- β やIFN- γ 等のサイトカインの発現調節に基づく細胞内のシグナル伝達系の促進（Eur. J. Biochem. 242: 460-466 (1996)）といった細胞作用及び細胞機能の制御に重要な役割を果たしていることを見出した。本発明はこのような知見に基づくものである。

【0006】すなわち、本発明は下記一般式（1）で表わされるカルボステリル誘導体及びその塩から選ばれる少なくとも1種の化合物を有効成分として含有することを特徴とするTSC-22誘導剤である。

【0007】

【化2】



(1)

また本発明は、上記カルボステリル誘導体が6-(4-(3,4-ジメトキシベンゾイル)-1-ピペラジニル)-3,4-ジヒドロカルボステリルである上記TSC-22誘導剤である。

【0008】本発明の誘導剤は、後記実施例に示すように、TGF- β 1等のタンパクの産生を介して或はこれを介することなく直接に、上記所望のTSC-22遺伝子の発現を誘導するものである。

【0009】TSC-22遺伝子は脳や心臓での発現が高く、脾臓や肝臓では発現が低く、末梢血では殆ど発現していないことが知られている。また当該遺伝子は、TGF- β で骨芽細胞を処理した後直ちに誘導されること、またFSHなどのホルモンに反応して誘導されることが明らかにされている。更に、TSC-22は、Cタイプナトリウム利尿ペプチド（CNP）のプロモーター

配剤に結合し、その転写を直接誘導することも知られている。

【0010】このため、本発明TSC-22誘導剤は、骨粗鬆症等の骨形成不全症、内分泌疾患、あるいはそれに連発して起こる水分貯留による心疾患、腎疾患等の各種疾患の治療、予防薬として有用である。また、本誘導剤を含む各種薬剤による血液毒性、肝・脾毒性の発現の予測あるいは予防法の開発に有用となる。

【0011】

【発明の実施の形態】上記一般式(1)において示される各基は、より具体的にはそれぞれ次の通りである。即ち、低級アルコキシ基としては、例えばメトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、tert-ブトキシ、ペンチルオキシ、ヘキシルオキシ基等の炭素数1～6の直鎖又は分枝鎖状アルコキシ基を例示できる。

【0012】フェニル環上に置換基として低級アルコキシ基を有することのあるベンゾイル基としては、例えばベンゾイル、2-メトキシベンゾイル、3-メトキシベンゾイル、4-メトキシベンゾイル、2-エトキシベンゾイル、3-エトキシベンゾイル、4-エトキシベンゾイル、3-イソプロポキシベンゾイル、4-ブトキシベンゾイル、2-ペンチルオキシベンゾイル、3-ヘキシルオキシベンゾイル、3,4-ジメトキシベンゾイル、2,5-ジメトキシベンゾイル、3,4,5-トリメトキシベンゾイル基等のフェニル環上に置換基として炭素数1～6の直鎖状又は分枝鎖状アルコキシ基を1～3個有することのあるベンゾイル基を例示できる。

【0013】本発明において有効成分とする上記カルボステリル誘導体中、特に好ましいものとしては、例えば6-(4-(3,4-ジメトキシベンゾイル)-1-ヒペラジニル)-3,4-ジヒドロカルボステリル(「ベスナリノン」)を例示できる。

【0014】上記カルボステリル誘導体の塩には、通常の酸を用いて形成される薬理学的に許容される酸付加塩が含まれる。該塩を形成する酸性化合物としては、具体的には例えば硫酸、リン酸、硝酸、塩酸、無水酢酸等の無機酸、酢酸、乳酸、マレイン酸、フマル酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、コハク酸、エタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、安息香酸等の有機酸を例示することができる。

【0015】なお、一般式(1)で表されるカルボステリル誘導体及びその塩は、例えば特公平1-43747号公報に記載される製法に従って製造することができる。

【0016】本発明の誘導剤の有効成分である一般式(1)のカルボステリル誘導体又はその塩は、通常、一般的な医薬製剤の形態で用いられる。かかる製剤は、通常使用される充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤等の希釈剤乃至賦形剤を用いて

調製される。この医薬製剤としては各種の形態が治療目的に応じて選択でき、その代表的なものとしては錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤、カプセル剤、坐剤、注射剤(液剤、懸濁剤等)等を例示できる。

【0017】錠剤の形態に成形するに際しては、粗体としてこの分野で従来公知のものを広く使用でき、例えば乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、尿素、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、結晶セルロース、クイ酸等の賦形剤、水、エタノール、プロパノール、単シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン溶液、カルボキシメチルセルロース、セラック、メチルセルロース、リン酸カリウム、ポリビニルピロリドン等の結合剤、乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン素、ラミナラン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド、デンプン、乳糖等の崩壊剤、白糖、ステアリン、カカオバター、水素添加油等の崩壊抑制剤、第4級アンモニウム塩基、ラウリル硫酸ナトリウム等の吸収促進剤、グリセリン、デンプン等の保湿剤、デンプン、乳糖、カオリン、ベントナイト、コロイド状クイ酸等の吸着剤、精製タルク、ステアリン酸塩、ホウ酸末、ポリエチレングリコール等の滑沢剤等を例示できる。更に錠剤は必要に応じて通常の包皮を施した錠剤、例えば糖衣錠、ゼラチン被包錠、腸溶被包錠、フィルムコーティング錠に調製することもできるし、また二重錠、多層錠とすることもできる。

【0018】丸剤の形態に成形するに際しては、粗体としてこの分野で従来公知のものを広く使用でき、例えばブドウ糖、乳糖、デンプン、カカオ脂、硬化植物油、カオリン、タルク等の賦形剤、アラビアゴム末、トラガント末、ゼラチン、エタノール等の結合剤、ラミナランカンテン等の崩壊剤等を例示できる。

【0019】坐剤の形態に成形するに際しては、粗体として従来公知のものを広く使用でき、例えばポリエチレングリコール、カカオ脂、高級アルコール、高級アルコールのエステル類、ゼラチン、半合成グリセリド等を挙げることができる。

【0020】注射剤として調製される場合には、液剤及び懸濁剤は殺菌され、且つ血液と等張であるのが好ましく、これら液剤、乳剤及び懸濁剤の形態に成形するに際しては、希釈剤としてこの分野において慣用されているものを全て使用でき、例えば水、エチルアルコール、プロピレングリコール、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類等を挙げることができる。尚、この場合等張性の溶液を調製するに十分な量の食塩、ブドウ糖、グリセリン等を医薬製剤中に含有させてもよく、また通常の溶解補助剤、緩衝剤、無痛化剤等を添加してもよい。

【0021】更に本発明の誘導剤の中には、必要に応じて

着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤等や他の医薬品を含有させてもよい。

【0022】本発明の誘導剤中に有効成分として含まれる式(1)で示されるカルボステリル誘導体又はその塩の量は、特に限定されず広範囲より適宜選択されるが、通常全組成物中約1〜70重量%、好ましくは約1〜30重量%程度の範囲とするのが適当である。

【0023】かくして得られる本発明の誘導剤の投与方法は特に制限はなく、各種製剤形態、患者の年齢、性別、その他の条件、疾患の程度に応じて決定される。例えば、注射剤形態の医薬製剤として調製した場合には、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、腹腔内投与等により投与され得る。これは必要に応じてブドウ糖、アミノ酸等の通常の補液と混合して静脈内投与することもできる。錠剤、丸剤、顆粒剤、カプセル剤等の固形形態や経口投与

用液剤形態の医薬製剤とする場合は、経口又は経腸投与され得る。また坐剤は直腸内投与できる。

【0024】本発明の誘導剤の投与量は、広範囲から適宜選択でき、特に限定されるものではないが、通常一般式(1)のカルボステリル誘導体又はその塩が、一日当たり体重1kg当たり約0.5〜30mg程度の範囲から選択される量とされるのがよく、また投与単位形態中にこれらの有効成分が約10〜1000mg含有されるのが適当である。また本発明のTSC-22誘導剤の投与は、一日1回又は一日3〜4回に分けることもできる。

【0025】

【実施例】以下、本発明を更に詳しく説明するため製剤例及び実験例を挙げる。

【0026】

【製剤例1】

| | |
|--------------|-------|
| ベスナリノン | 5mg |
| デンプン | 132mg |
| マグネシウムステアレート | 18mg |
| 乳糖 | 45mg |
| 計 | 200mg |

1錠中、上記組成物を含有する錠剤を製造した。

【製剤例2】

【0027】

| | |
|--------------------|------|
| ベスナリノン | 150g |
| アビセル(商標名、旭化成株式会社製) | 40g |
| コーンスターチ | 30g |
| ステアリン酸マグネシウム | 2g |
| ヒドロキシプロピルメチルセルロース | 10g |
| ポリエチレングリコール-6000 | 3g |
| ヒマシ油 | 40g |
| メタノール | 40g |

上記有効成分化合物、アビセル、コーンスターチ及びステアリン酸マグネシウムを混合研磨機、篩衣R10mmのキネで打錠する。得られた錠剤をヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリエチレングリコール-6000、ヒマシ油及びメタノールからなるフィルムコーティ

ング剤で被覆を行ない、フィルムコーティング錠を製造する。

【0028】

【製剤例3】

| | |
|--------------------------|--------|
| ベスナリノン | 150.0g |
| クエン酸 | 1.0g |
| ラクトース | 33.5g |
| リン酸二カルシウム | 70.0g |
| フルロニックD-68 | 30.0g |
| ラウリル硫酸ナトリウム | 15.0g |
| ポリビニルピロリドン | 15.0g |
| ポリエチレングリコール(カルボワックス1500) | 4.5g |
| ポリエチレングリコール(カルボワックス6000) | 45.0g |
| コーンスターチ | 30.0g |
| 乾燥ラウリル硫酸ナトリウム | 3.0g |
| 乾燥ステアリン酸マグネシウム | 3.0g |
| エタノール | 適量 |

上記有効成分化合物、クエン酸、ラクトース、リン酸二カルシウム、フルロニックD-68及びラウリル硫酸ナ

トリウムを混合する。

【0029】上記混合物をNo. 60スクリーンにて篩

別し、ポリビニルピロリドン、カルボワックス1500及びカルボワックス6000を含むアルコール性溶液で湿式結核化する。必要に応じてアルコールを添加し、粉末をペースト状態にする。コーンスターチを添加し、均一な粒子が形成されるまで混合を続ける。No. 10スクリーンを通過させ、トレイに入れ、100℃のオーブンで12~14時間乾燥する。乾燥粒子をNo. 16スクリーンで篩別し、乾燥ラウリル硫酸ナトリウム及び乾燥ステアリン酸マグネシウムを加え、混合し、打錠機で所望の形状に圧縮成形する。

【0030】上記芯部をワニスで処理し、タルクを散布して湿気の吸収を防止する。芯部の周囲に下塗り層を被覆する。内服用のために充分な固さのワニス被覆を行なう。錠剤を完全に丸く且つ滑らかにするために、更に下塗り層及び平滑被覆を適用する。所望の色合が得られるまで着色被覆を行なう。乾燥後、被覆錠剤を磨いて均一な光沢の錠剤を調製する。

10090

【実験例】以下に記載する実験例で使用するペスタリノン及びTVS細胞の調整、並びに実験例で用いた種々の操作は、次の方法に従って行った。

【0032】 (1) 欠ナリノ落ノ同

ベスナリノンは、予めジメチルスルホキシド(DMSO)を用いて10 mg/ml濃度のストック溶液として調製しておいた。該ストック溶液中のベスナリノンの抗増殖活性は、4℃で少なくとも1ヶ月間安定であった。使用する前に完全培地で希釈して、所望濃度に調製して用いた。

【0033】(2) TYS細胞の調製及び培養: ヒト唾液腺扁平上皮癌細胞TYS (Am. J. Pathol., 124, 496-509 (1986)) は、10% 仔ウシ血清 (FCS; Gibco-Whittaker), 100 μ g/ml ストレプトマイシン, 100 U/ml ペニシリン (Gibco Labs.) 及び 0.25 μ g/ml イオンホテリン B (Gibco Labs.) を添加したダルベッコ改良イーグル培地 (DMEM; Gibco Labs.) を用いて、95% 湿気及び 5% CO₂ 存在下、恒温恒気下において 37℃ で培養することにより、調製した。

【0034】(3) ポリメラーゼチェーンリアクション
(PCR)

PCRは、反応液中の最終dNTPs濃度及び最終プライマー濃度をそれぞれ200 μ M及び1 μ Mとし、該反応液にTaqDNAポリメラーゼ (Takara) を最終濃度が0.05 U/ μ lとなるように加えて、サーマルシークエンス (Isaki Glass) を用いて行った (94℃3分、94℃1分、55℃1.5分、72℃2.5分の30サイクルと72℃4分の延長)。

(4) ノーサンフロッツ更新

細胞質RNA (20 μ g) を、ホルムアルデヒド/1.0% アガロースゲルにて電気泳動し、これをナイロンフィルター (Hybond-N; Amersham) にブロットした。この

ナイロンフィルターを、5.0%ホルムアミド、5×生理食塩-リン酸ナトリウム-EDTA (saline-sodium phosphate-EDTA)、0.1% SDS、5×デンハルト (Denhardt's) 溶液及び100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ サク精子DNA存在下に、42℃、15~20時間、³²P標識cDNAプローブとハイブリダイゼーションを行った。0.1×SSC (standard saline citrate)-0.5% SDSにて、室温で2回及び50℃40分間にて1回、十分に洗浄した。X線フィルムへの露光は、増感スクリーンを用いて-70℃で行なった。

【0035】使用したプロンプは、ヒトTSC-22c DNAの3'末端(1.2kb)、TYS細胞よりクローニングした完全なオープンリーディングフレームを有するヒトp21^{ras} cDNAの875bpフラグメント(Cancer Lett. 112: 181-189 (1997))及びヒトβ-アクトリンpHFA-1 (ATCC No.77644; HFFC446)のXhoI-XhoIフラグメント(2.1kb)である。

【0036】シグナルのデシントストリッパ解析は、N
1用イメージ1、44プログラム及び/又はBAS-2
000Hイメージ解析システム(Fuji photo file)に
よって行なった。

【0037】実施例1、インヒトリ細胞増殖に対するベ
スナリノンの影響

TY S細胞のインビトロ増殖に対するベスナリノンの影響(抗増殖作用)を、MTTアッセイ法(3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイド) (Cancer Res. 47: 936-942 (1987))を用いて評価した。

【0038】具体的には、96ウェルプレート (Falcon
n: Becton Dickinson Labware) の10%FCSを含む
DMEM中に、TVS細胞を 2×10^5 細胞/ウェルと
なるようにまいた。24時間後、細胞を、種々の濃度の
ベスナリノン(0, 0.1, 1, 10, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を含むDMEM(10%FCS含有)培地中に移
し、2~4日後、MTT (Sigma) を用いたアッセイに
より細胞数を定量化した。

【0039】結果を図1に示す。これから分かるように、ベスナリノンは $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度ではTYS細胞の増殖を殆ど抑制しなかったが、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度では著しく抑制した。ベスナリノンのTYS細胞に対する増殖阻害活性は、細胞静止性であるが細胞致死性ではなかった。 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のベスナリノンで処理したTYS細胞は拡大し細胞分裂が停止したが、培養皿の底から剥離しなかった。

【0040】また、ベスナリノン 細胞増殖阻害剤として用いたDMSOの抗増殖作用を確認した。結果、DMSOは僅かにTYS細胞の増殖を阻害したものの、ベスナリノンの抗増殖作用に比較してその程度は非常に低かった。

00411 2002 0000000000

TYPE 3: 2+4/2 (50ug/ml) DE

スナリノン処理は、ハウスキーピング遺伝子の発現を低下させ、TYS細胞における細胞増殖、アポトーシス及び分化に関連する遺伝子の発現を相対的に増加させることがわかった。公知遺伝子の約30% (例えば、TSC-22、HSC70、CK19、SOS、NGFR関連リンパ球活性化分子、IL-6、TAP11A、エロンゲーションファクター-1 α 、IL-1/TNF誘導EST、DNA結合タンパクA、アネキシンII、DNA依存性蛋白キナーゼ触媒サブユニット、rabb-GDI、SUI1細胞開始因子、リソソーム防御タンパク、TNF α 誘導タンパクB12、ADP-リボシレーション因子、ホスホリパーゼA2及び13kDa、分化関連タンパク等)が、細胞増殖、分化及びアポトーシスに関連しているようである。

【0052】また、ノーザンブロットングを用いて、上記公知遺伝子及び未知遺伝子の発現を、ベスナリノン未処理TYS細胞とベスナリノン処理TYS細胞との間で比較した。その結果、ベスナリノン処理によりTSC-22 mRNAの発現が増加することが明らかとなった。しかしながら、他の遺伝子の発現はTYS細胞のベスナリノン処理によって変化しないか、減少していた。

【0053】(4) ヒトTSC-22 cDNAの単離 ランダムシークエンシングで得られたクローン (pBK-CMV-hTSC-22の3'末端) は、1313bpのヒトTSC-22 cDNAフラグメントだけを含み、完全なオープンリーディングフレームを含んでいたため、完全長のヒトTSC-22 cDNAをクローニングすることを試みた。

プライマー DP1: 5'-agccagttgtgcaggtggccotgaa-3'
 DP2: 5'-tctgcagttggccotgaaactgggc-3'
 mUP: 5'-atctatcttggccacacaga-3'
 T7 RNAポリメラーゼプロモーター
 : 5'-taatacgaactcctaataagg-3'

本発明において腫瘍細胞株から取得されたヒトTSC-22のヌクレオチド配列は、ジョイ等によって最近ヒト胎児 (embryo) から取得されたものと完全に一致した (Biochem. Biophys. Res. Commun. 222: 821-826 (1996))。ヌクレオチド配列分析によって、ヒトTSC-22遺伝子は、マウス又はラットTSC-22遺伝子と比べて79%のホモロジーがあることがわかった。しかし、ヒトTSC-22のコーディング領域におけるヌクレオチド配列は、マウス又はラットTSC-22のそれと92%一致した。

【0059】一方、それから推定されるヒトTSC-22タンパクのアミノ酸配列は、マウス又はラットTSC-22タンパクのそれと98%一致した。マウス及びラットのTSC-22タンパクは143個のアミノ酸を含んでいるのに対して (Shibanuma et al., J. Biol. Chem., 267: 10219-10224 (1992); Hamil and Hall, Endocr

【0054】アンチセンスオリエンテーションフォーム CMVプロモーター中にベスナリノン処理TYS cDNAを含む100ngのpBK-CMVライブラリーを、DP1プライマーを用いてPCRにより増幅した。

【0055】次いで、cDNAの上流に所在するT7 RNAポリメラーゼプロモーターをベクターに挿入した。引き続き、PCR生成物を第2ラウンドのPCRに供した。第2ラウンドPCRにはプライマーとして、DP1プライマーの7bp上流に所在するPstIサイトを含有するDP2プライマー、およびマウスTSC-22の翻訳開始コドンから92bp上流またはラットにおける84bp上流に位置するマウス及びラットのTSC-22配列から取得されるmUPを用いた (J. Biol. Chem. 267: 10219-10224 (1992); Endocrinology 134: 1205-1212 (1994))。

【0056】ヒトTSC-22の5'末端を含む第2ラウンドのPCR生成物をpUC19ベクターにサブクローニングした (pUC19-hTSC-22の5'末端)。pBK-CMV-hTSC-22の3'末端に由来するPstI消化hTSC-22の3'末端フラグメントを、予めPstIで消化しておいたpUC19-hTSC-22の5'末端にライゲートした。これからほぼ完全長のヒトTSC-22 cDNAが単離された。

【0057】用いた各種プライマー及びプロモーターの塩基配列を表2に示す。

【0058】

【表2】

inology 134, 1205-1212 (1994))、ヒトTSC-22タンパクは144個のアミノ酸を含んでいた。また、ヒトTSC-22では、コドン43位にセリン残基が一つ挿入されており、マウス及びラットにおけるコドン141位のセリン残基 (ヒトではコドン142位) がプロリン残基に置換されていた。また、ヒトTSC-22タンパクには、ロイシン-77〜ロイシン-98の領域にロイシンジッパー様構造が保存されていた。

【0060】なお、TSC-22タンパクは、ロイシンジッパー様構造を有するタンパクであり、TGF- β 又はFSH誘導転写レギュレーターとして作用することが報告されている (TGF- β or FSH inducible putative transcriptional regulator)。

【0061】実験例4. TYS細胞のベスナリノン処理によるTSC-22 mRNA発現の誘導

(1) TYS細胞をベスナリノンで処理することによ

で誘導されるTSC-22 mRNAの発現をノーザンブロット分析を用いて調べた。

【0062】具体的には、TYS細胞をベスナリノン(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DMEM)で処理し、次いで該TYS細胞から細胞質RNAを調製し、1%変性アガロースゲル上で電気泳動した。それをナイロンフィルターに転写し、ヒトTSC-22及び β -アクトニン用の³²P-標識プローブにハイブリダイズし、オートラジオグラフィによりTSC-22 mRNAの発現状況を調べた。また、得られたオートラジオグラフをデンストメトリック走査計で評価した。また、対照実験としてベスナリノン未処理のTYS細胞についても同様にTSC-22 mRNA発現を調べた。結果を図3に示す。

【0063】TYS細胞中に、約1.8 kbのTSC-22 mRNAが検出された。TYS細胞のTSC-22 mRNAレベルは、細胞がコンフルエンスに達するまで持続的に増加した(図3)。TYS細胞中のTSC-22 mRNA発現は、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ベスナリノン処理によって著しく増加した(1日目:コントロールの225%、2日目:コントロールの164%、3日目:コントロールの125%)(図3、B)。また、TSC-22 mRNAの誘導はベスナリノン添加後、少なくとも3日間続いた。

【0064】(2) 次に、ベスナリノン処理によるTSC-22 mRNAの誘導状況を経時的に追跡した。参考として、公知のTSC-22誘導因子であるトランスフォーミング成長因子- β 1(TGF- β 1)を用いて同様に行った。具体的には、1、2、6、12及び24時間の各時間にわたりTYS細胞をベスナリノン及びTGF- β 1のそれぞれで処理し、得られたTYS細胞から細胞質RNAを調製し、該RNA(20 $\mu\text{g}/\text{レーン}$)を1%変性アガロースゲルで電気泳動した。次いで、ナイロンフィルターに移し、ヒトTSC-22及び β -アクトニン用の³²P-標識プローブにハイブリダイズしてオートラジオグラフィに供した。得られたオートラジオグラフをデンストメトリックス走査計で評価した。結果を図4に示す。

【0065】これからわかるように、短時間のベスナリノン処理ではTSC-22 mRNAはあまり誘導されないが、24時間処理することによって急激にTSC-22 mRNA発現が増加した(図4、B)。一方、TGF- β 1処理では、短時間の処理でTSC-22 mRNAが速やかに誘導された(図4、B)。

【0066】(3) また、TSC-22 mRNA発現誘導がベスナリノンの直接の効果であるかを明らかにするために、タンパク合成阻害剤であるシクロヘキシミドで処理して、その遺伝子誘導に対する影響を調べた。また、参考として、ベスナリノンによって誘導されるp21^{waf1} mRNAの発現に対するシクロヘキシミドの影響についても調べた。

【0067】具体的には、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のシクロヘキシミドの存在又は非存在下で、TYS細胞を2時間、4時間又は6時間の各時間にわたりベスナリノン(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)で処理し、得られたTYS細胞から細胞質RNAを調製し、1%変性アガロースゲルで電気泳動した(RNA:20 $\mu\text{g}/\text{レーン}$)。次いで、ナイロンフィルターに転写して、ヒトTSC-22、p21^{waf1}及び β -アクトニン用の³²P-標識プローブにハイブリダイズしてオートラジオグラフィに供した。得られたオートラジオグラフをデンストメトリック走査計で評価した。対照として、ベスナリノン未処理のTYS細胞についても同様に実験を行った。結果を図5に示す。

【0068】これからわかるように、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のシクロヘキシミドの処理によって、おそらくはmRNAの蓄積に起因して、TSC-22 mRNAの発現は著しく増加したが、ベスナリノンによるTSC-22遺伝子の誘導は抑制された(図5、B)。一方、ベスナリノンによるp21^{waf1}遺伝子の誘導はシクロヘキシミドの処理によって阻害されなかった(図5)。

【0069】(4) 結論

上記で示すように、TSC-22のmRNA発現は、数時間ベスナリノンで処理することによってわずかに増加したが、TSC-22 mRNAの誘導はベスナリノンの添加後24時間で観察され、それは少なくとも3日間持続した。他方、TGF- β 1処理では短時間でTSC-22 mRNAの速やかな誘導が観察された。また、Shibamura、並びにIliu及びIliuらは、TGF- β 1又はFBSHによるマウス及びラット細胞のTSC-22の誘導は、Jun及びFosのように、急激ではあるが一時的なものであると報告している(J. Biol. Chem. 267:10219-10224(1992); Endocrinology 134: 1205-1212(1994))。また我々も、以前ベスナリノンがTYS細胞中でTGF- β 1タンパクの誘導を促進することを報告している(Cancer Lett. 112: 181-189(1997))。

【0070】これらのことから、少なくとも本発明のヒトTYS細胞システムにおいて、ベスナリノンは、初めにその直接的な作用を介してTSC-22 mRNAの発現を誘導し、その後TGF- β 等の他のタンパクの産生を介して、TSC-22 mRNAの発現を増強するように働くと考えられる。

【0071】実験例5、TSC-22タンパクの検出

(1) YYS細胞から調製した100 μg のタンパクについてSDS-PAGEを行った。ゲルから該タンパクをニトロセルロースフィルター(Bi-Gel)に転写した。膜上のTSC-22タンパクをアフィニティー精製-抗グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)-TSC-22融合蛋白ウサギポリクローナル抗体及びアマシヤムECLキット(Amersham)を用いて検出した。結果を図6Aに示す。図からわかるように、20 kDa及び18 kDaの位置に2つのバンドが検出された。置移動

バンドはTSC-22タンパクのリン酸化フォームのようである。

【0072】(2) また、ベスナリノン処理によるTYS細胞中のTSC-22蛋白発現上昇を固相ELISAにより測定した。100 μ gのタンパクを96ウェルプレート (Falcon) に添加し、室温で3時間インキュベートした。第1抗体 (アフィニティー精製抗GST-TSC-22融合蛋白ウサギ抗体; 1:2000) をウェルに添加し、室温で3時間インキュベートした。リン酸緩衝生理食塩水で洗浄後、HRP-コンジュゲート-ビツジ抗ウサギIgG (Aershas, 1:500) をウェルに添加し、室温で1時間インキュベーションした。次いで、100 μ lのTMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, 0.1 mg/ml; Sigma) 溶液をウェルに加えて10分間インキュベートした。反応を1M H_2SO_4 40

μ l添加して停止し、450nmの吸光度を測定した。結果を図6Bに示す。

【0073】かかる固相ELISA法により、ベスナリノン処理によりTYS細胞中に産生されたTSC-22タンパク量は、未処理の細胞と比較して増加していることが示された。

【0074】実験例6、ヒトTSC-22 mRNAに対するアンチセンス・オリゴヌクレオチドの、ベスナリノン処理TYS細胞又は未処理TYS細胞への影響
ヒトTSC-22 mRNAに対するアンチセンス・ホスホロチオエート・オリゴヌクレオチド (phosphorothioate-oligonucleotide) およびセンス・ホスホロチオエート・オリゴヌクレオチドを合成した (表3)。

【0075】

【表3】

7'アタグス・ホスホロチオエート・オリゴヌクレオチド' : 5'-tggaatttcATgcaatttgc-3'

3'アタグス・ホスホロチオエート・オリゴヌクレオチド' : 5'-tgcaatttcATgcaatttgc-3'

ベスナリノン処理TYS細胞及び未処理TYS細胞のそれぞれを、これらのオリゴヌクレオチドで処理して、細胞増殖に対する影響を調べた。具体的には、TYS細胞がコンフルエンスに達したとき若しくは細胞が急速に増殖した際に、直接培養細胞中にこれらのオリゴヌクレオチドを添加することによって細胞を処理した。細胞の数はMTTアッセイにより評価した。

【0076】結果を図7に示す。これからわかるように、TYS細胞を10 μ Mのセンス・オリゴヌクレオチドで処理することにより、おそらくは高用量のオリゴヌクレオチドの非特異性細胞毒性に起因して、細胞の増殖がわずかに阻害された。しかしながら、等濃度のアンチセンス・オリゴヌクレオチドによる処理はTYS細胞の増殖を促進した ($p < 0.01$)。さらに、アンチセンス・オリゴヌクレオチドはTYS細胞に対するベスナリノンの抗増殖作用を抑制した。ただし、この実験において、TYS細胞のベスナリノンによる処理は、細胞がコンフルエンスに達した時に開始したため、ベスナリノンのTYS細胞に対する抗増殖効果は図1に示される程強くなかった。

【0077】一方、TYS細胞を、低密度培養条件下 (2 \times 10³/ウェル)、ベスナリノンの存在若しくは非存在下で、アンチセンス・オリゴヌクレオチドで処理した場合、アンチセンス・オリゴヌクレオチドの明確な効果を示すことはできなかった。図3に示すように、TYS細胞中のTSC-22 mRNAの発現は、低密度培養条件下で非常に低かったが、細胞がコンフルエンスに達するまで徐々に増加した。このことからアンチセンス・オリゴヌクレオチドは高密度培養条件下で、TYS細胞中のTSC-22 mRNAの発現を有効に阻害したと考えられる。

【0078】以上の実験から、次のように考察される。

【0079】TSC-22 mRNAの発現レベルは、培養の細胞密度及び細胞サイクルによく比例した。TSC-22 mRNAのレベルは増殖環境下では低かったが、細胞がコンフルエントに達するとmRNAレベルは著しく増加した。ベスナリノンはTYS細胞中のTSC-22 mRNAの発現を増加させ、G1相で細胞サイクルを停止することによって著しく細胞増殖を抑制した。またTSC-22 mRNAに対するアンチセンス・オリゴヌクレオチドは、細胞がコンフルエントに達した後にTYS細胞の増殖を促進し、ベスナリノンの抗増殖効果を抑制した。これらのことから、TSC-22はTYS細胞株の成長・増殖をマイナスに制御し、TYS細胞においてベスナリノンからの増殖阻害シグナルを、少なくとも一部において、媒介していると思われる。

【0080】ヒトTSC-22タンパクのアミノ酸配列は、マウス及びラットの配列と98%一致した (1アミノ酸の挿入、1アミノ酸の置換)。このように種を越えて高い割合でアミノ酸配列が保存されていることは、TSC-22が、細胞成長/増殖、分化及びアポトーシスといった細胞作用の制御に重要な果たしていることを示している。

【0081】Shihannua、並びにHsall及びHsallらは、ヒトTSC-22タンパクはまたロイシンジッパードメインのN末端の塩基性領域を欠乏していることを報告している (J. Biol. Chem. 267: 10219-10224 (1992); Endocrinology 134: 1205-1212 (1994))。このことから、ヒトTSC-22は、CHOP (Genes Dev. 6: 439-453 (1992)) 又はIP-1 (Cell 64: 983-993 (1991)) のように、塩基性のロイシンジッパー転写因子と相互作用し、ドミナントネガティブ制御因子として作用していると考えられる。CHOPは転写因子のC/E B Pファミリーとホモロジーがあり、GADD (Growth Arrest and DN

A Damage) 153としても知られており (Mol. Cell. Biol. 9: 4196-4203 (1989)), またC/EBPのドミナントネガティブインヒビターとして作用する (Genes Dev. 6: 439-453 (1992); Genes Dev. 8: 453-464 (1994))。該CHOP (GADD153) 遺伝子の発現は、成長抑制またはDNAダメージを引き起こす幾つかの試薬によって誘導される (Mol. Cell. Biol. 9: 4196-4203 (1989))。加えて、ドミナントレギュレーターIdはDNA結合領域を欠如したヘリックス-ループ-ヘリックス蛋白であり、細胞成長及び分化の制御についての研究が良くなされている (Cell 61: 49-59 (1990))。Id (Id1, Id2, Id3及びId4) は特異的にヘリックス-ループ-ヘリックス蛋白 (MyoD, E2A, E12及びE47) に結合し、DNA結合能力を阻害する (Nucleic Acids Research 22: 749-755 (1994))。Idは筋形成 (Cell 61: 49-59 (1990); J. Biol. Chem. 269: 6031-6039 (1994))、神経形成 (Biochem. Biophys. Res. Commun. 199: 1355-1362 (1994)) 及び血液形成 (Cell 79: 893-900 (1994)) 並びに細胞成長/増殖 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 4985-4988 (1994)) を含む幾つかの細胞システムにおける分化を制御する。

【0082】このようにTSC-22は、これらの分子と同様にドミナントネガティブ調節因子である可能性が高く、多くのロイシンジッパー転写因子の機能を阻害することによって種々の生物現象に影響を与えようと考えられる。また、本発明のTSC-22誘導剤はその機能的蛋白質が関与する疾患の治療、予防に有用である。

【0083】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 24

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号: primer

配列

AGCCAGTCTG CAGCTGGGC TGAA

24

配列番号: 2

配列の長さ: 25

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

配列

TCTGCAGCTG GGCCTGAAC TGCC

25

配列番号: 3

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

配列

ATCTAGTTTG AACCAAGCTG

26

配列番号: 4

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

配列

TAATACGACT CACTATAGGC

27

配列番号: 5

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

配列

TGGGATTTCATTCATTCGA

28

配列番号: 6

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

配列

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号: primer

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号: primer

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号: promoter

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号: modified base

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号: modified base

TGCAATGCA TGAAATCCCA

20

【図面の簡単な説明】

【図1】 TYS細胞のインビトロ増殖に対するベスナリノンの影響を示す図である。値は6回測定した平均値を示す。 $*p<0.01$ **増地中のベスナリノンの濃度($\mu\text{g}/\text{ml}$)。

【図2】 TYS細胞の細胞周期解析を示す図である。図中Aは、TYS細胞をベスナリノン非存在下で24時間、48時間及び72時間培養した結果を、また図中BはTYS細胞を $50\mu\text{g}/\text{ml}$ ベスナリノン存在下で24時間、48時間及び72時間培養した結果を示す。

【図3】 TYS細胞中のTSC-22のmRNA発現に対するベスナリノンの影響を示す図である。Aは、ベスナリノン($50\mu\text{g}/\text{ml}$)処理TYS細胞(+)又は未処理TYS細胞(-)から細胞質RNAを調製し、1%変性アガロースゲル上で分離し(RNA:20 $\mu\text{g}/\text{lane}$)、ナイロン膜に移して、ヒトTSC-22及び β -アクトニン用の ^{32}P -標識プローブにハイブリダイズした結果を示す図面に代わる写真である。Bは、Aで示すオートラジオグラフをデンストメトリックスキャンニングで測定した結果を示す。

【図4】 TYS細胞中での、ベスナリノン及びTGF- β 1によるTSC-22 mRNAの誘導の短時間の経時変化を示す図面である。Aは、図に示す時間(1, 2, 6, 12, 24時間)ベスナリノン又はTGF- β 1で処理したTYS細胞から細胞質RNAを調製し、該RNA(20 $\mu\text{g}/\text{lane}$)を1%変性アガロースゲル上で分離して、ナイロン膜に移し、次いでヒトTSC-22及び β -アクトニン用の ^{32}P -標識プローブにハイブリダイズした結果を示す図面に代わる写真である。Bは、Aで示すオートラジオグラフをデンストメトリックスキャンニングで測定した結果を示す。

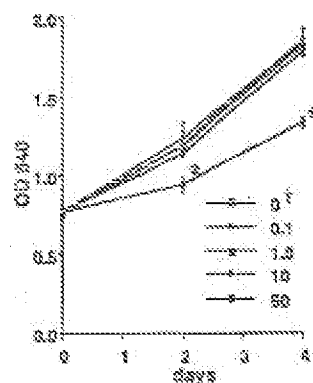
【図5】 TYS細胞中での、TSC-22及びp31 *p の誘導に対するシクロヘキシミドの影響を示す図で

ある。Aは、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のシクロヘキシミドの存在又は非存在下で図に示す時間(2, 4, 6時間)ベスナリノン($50\mu\text{g}/\text{ml}$)で処理したTYS細胞(+)又は未処理のTYS細胞(-)から細胞質RNAを調製し、1%変性アガロースゲル上で分離し(RNA:20 $\mu\text{g}/\text{lane}$)、ナイロン膜に移して、ヒトTSC-22、p31 *p 及び β -アクトニン用の ^{32}P -標識プローブにハイブリダイズした結果を示す図面に代わる写真である。Bは、Aで示すオートラジオグラフをデンストメトリックスキャンニングで測定した結果を示す。

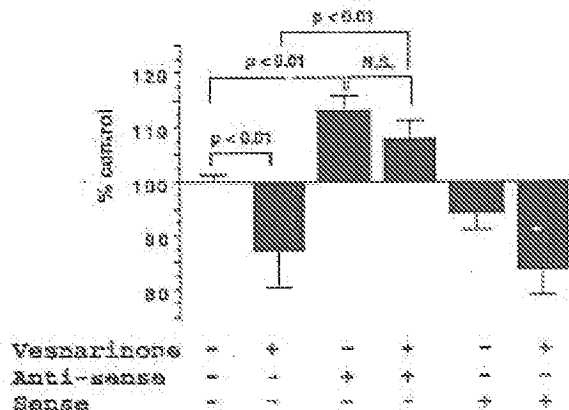
【図6】 Aは、TYS細胞中のTSC-22タンパクをウェスタンブロッティングによって検出した結果を示す図面に代わる写真である。TYS細胞に由来する100 μg のタンパクサンプル(TYS)または精製組換えGST-TSC-22タンパク100ng(GST-TSC-22)をSDS-PAGEに供し、ニトロセルロース膜に移し、アフィニティー精製抗-GST-TSC-22抗体で染色した。Bは、細胞中のTSC-22タンパクの固相ELISA法による検出結果を示す。図中、コントロールは未処理TYS細胞から調製された100 μg タンパク、DMSOは0.5%DMSOで48時間処理したTYS細胞から調製された100 μg タンパク、Vesは $50\mu\text{g}/\text{ml}$ ベスナリノンで48時間処理したTYS細胞から調製された100 μg タンパクの結果をそれぞれ示す。値は、それぞれ2回測定した平均値を示す。図中の挿入図は抗原としてGST-TSC-22融合タンパクを用いた固相ELISA用のスタンダードカーブを示す。

【図7】 ヒトTSC-22 mRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドにベスナリノン処理又は未処理TYS細胞に対する影響を示す図面である。数値は、6回試験した結果の平均を示す。

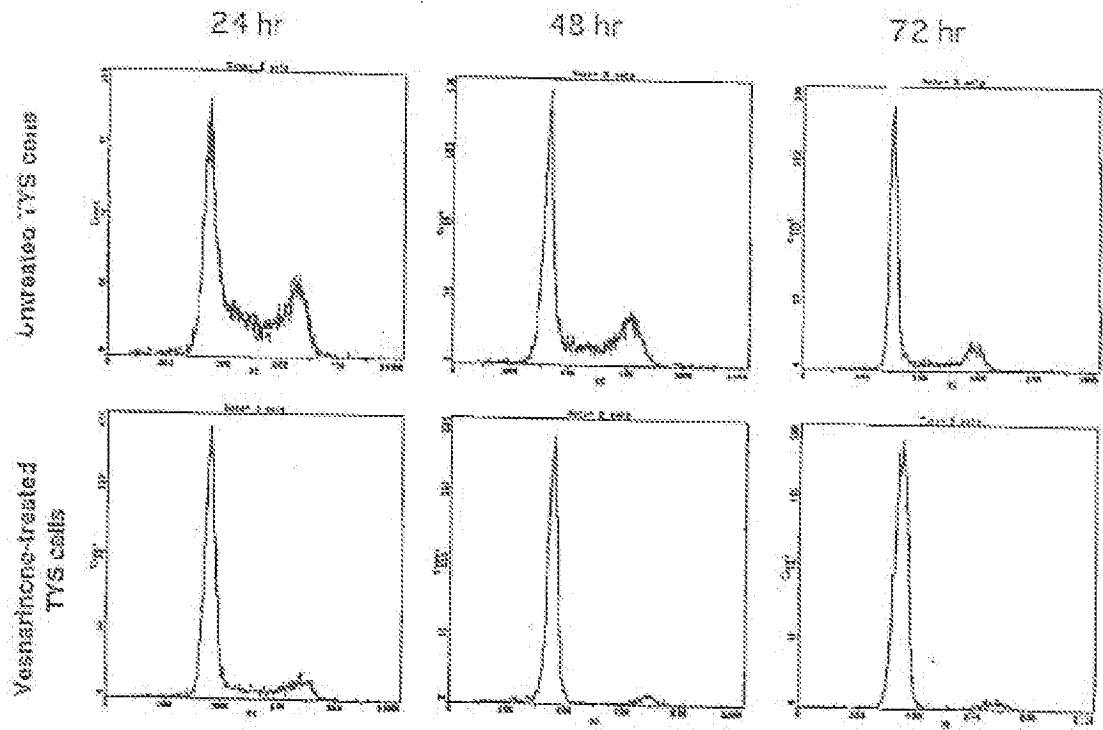
【図1】



【図7】

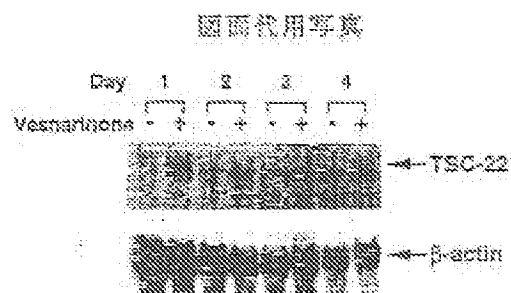


【図2】

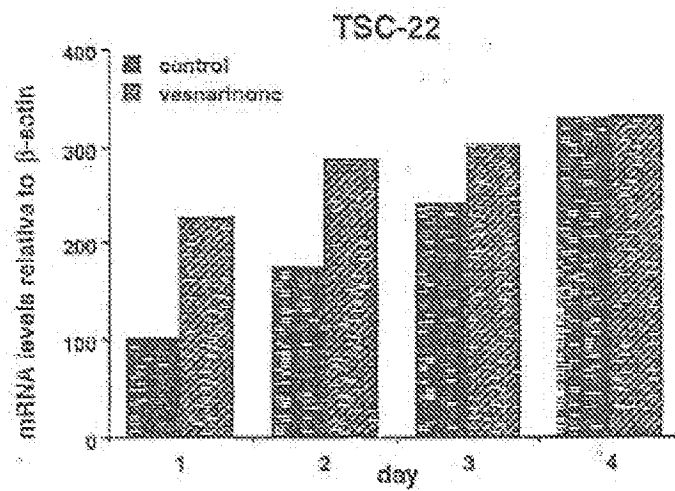


【図3】

A



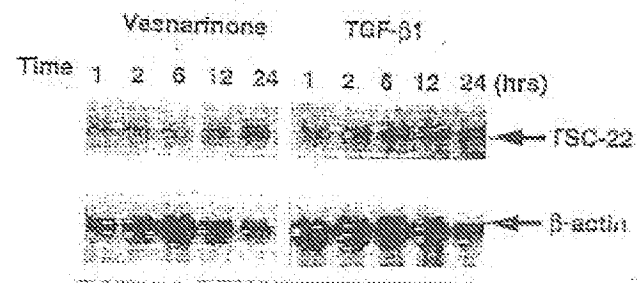
B



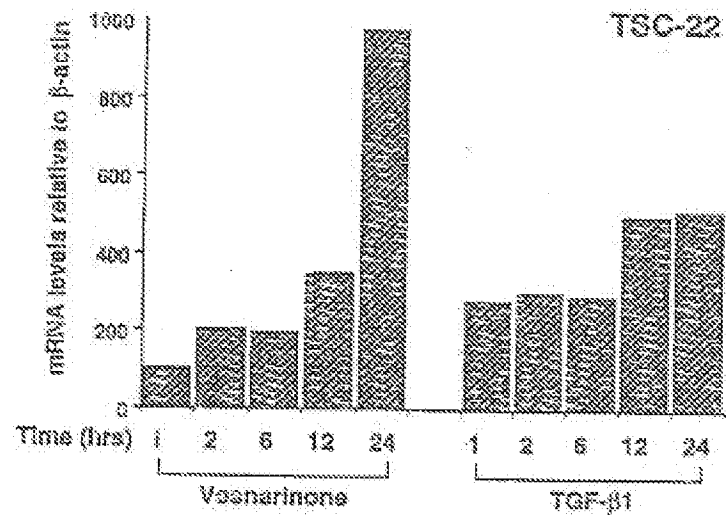
【図4】

A

図面代用写真



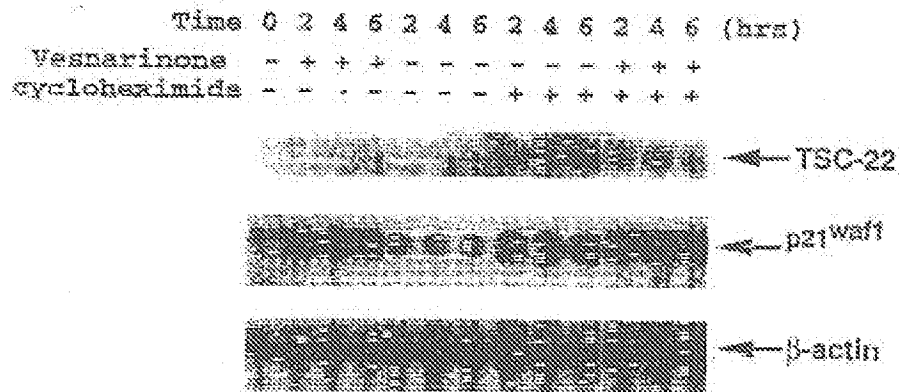
B



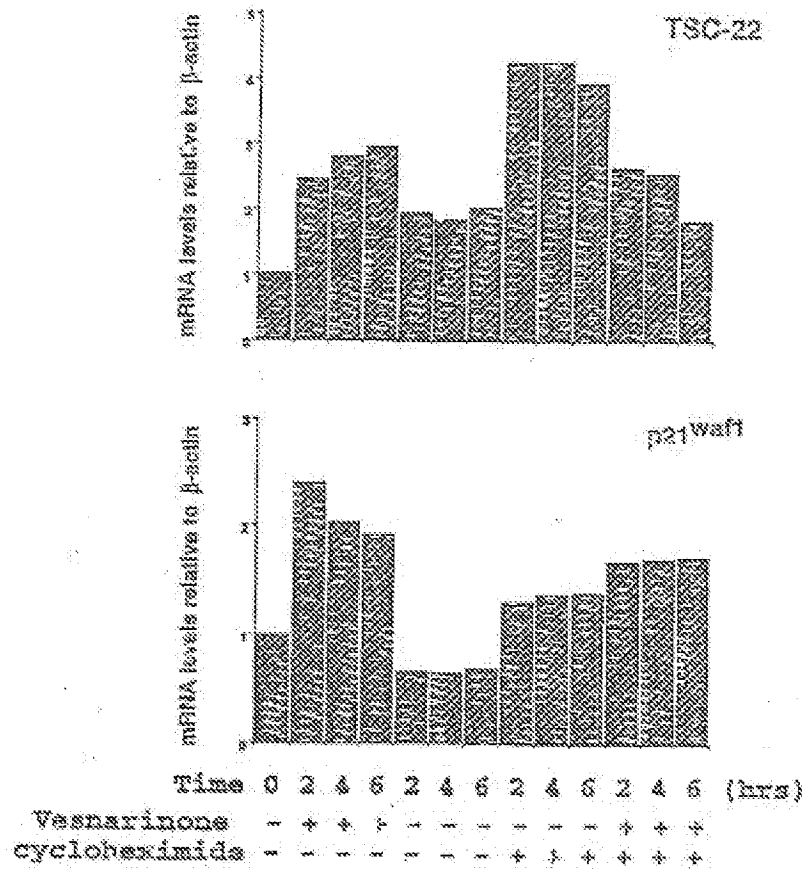
【図5】

A

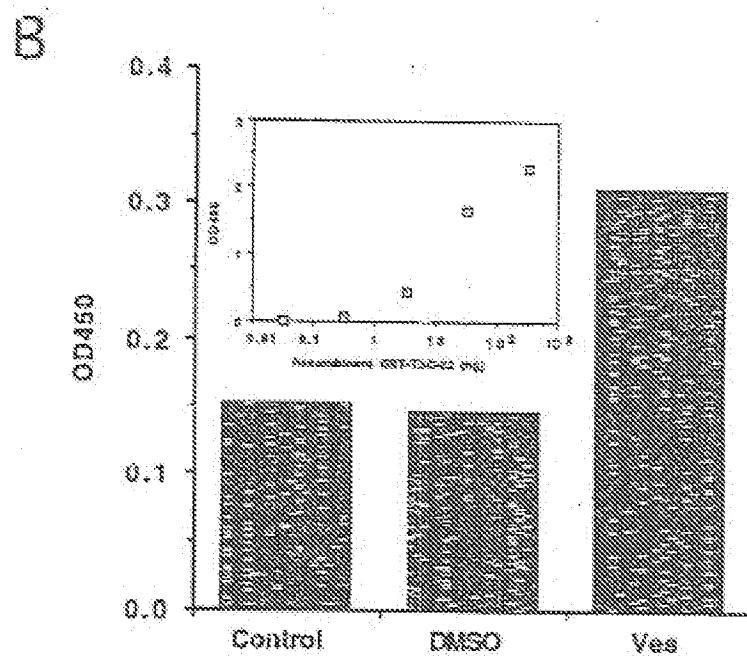
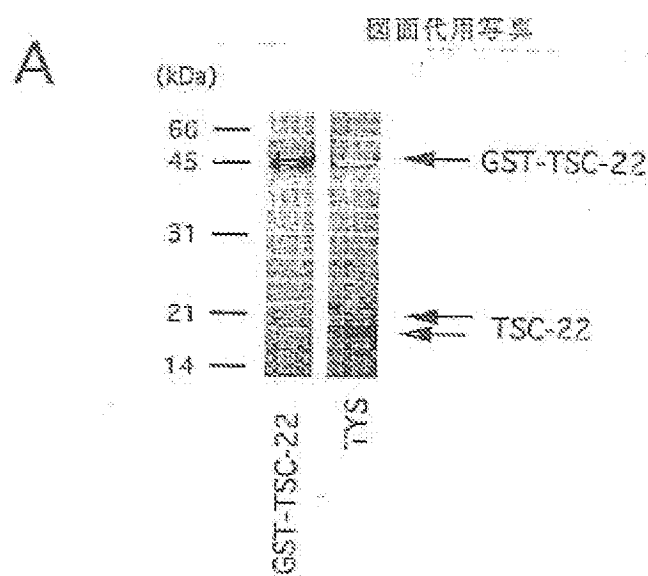
図面代用写真



B



【図6】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁶

識別記号

F1

// C07D 215/22

C07D 215/22